

# METHOD AND DEVICE FOR PRODUCING A CONTROLLABLE AND REPRODUCIBLE TEMPERATURE GRADIENT AND USE THEREOF

**Patent number:** DE3622591  
**Publication date:** 1988-01-14  
**Inventor:** ROSENBAUM VOLKER DIPL PHYS (DE); RIESNER DETLEV PROF DR (DE)  
**Applicant:** DIAGEN INST MOLEKULARBIO (DE)  
**Classification:**  
**- international:** B01D57/00; B01D15/08; C07H21/02; C07K3/12; B01D57/02; G01N25/02; G01N27/28; G01N30/90; G01N33/68; C12Q1/00; C12Q1/70  
**- european:** B01D43/00; B01D57/02; B01L7/00G; C02F9/00H4; G01N27/447B; G01N30/90  
**Application number:** DE19863622591 19860704  
**Priority number(s):** DE19863622591 19860704

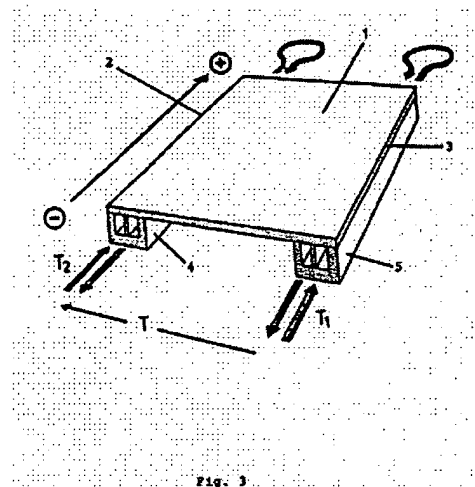
## Also published as:

EP0251306 (A1)  
 US5066377 (A1)  
 JP63027744 (A)  
 EP0251306 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE3622591  
 Abstract of corresponding document: US5066377

A method and a device for producing a controllable and reproducible temperature gradient in a predetermined direction of heat-conducting plates for the separation of mixtures of substances in sheet-shaped separating media wherein one edge of a plate is heated by means of one or more controllable heating means and the opposite edge of the plate is cooled by one or more controllable cooling means. In this way, the energy flows through the heating means and of the cooling means are greater than the energy flow across the plate. The method and device are suitable for separating mixtures of substances wherein at least one component undergoes a thermal conversion within the temperature range of the temperature gradient. Therefore, they are suitable for the detection of and differentiation between viroids, satellite RNAs, viruses containing double-strand or circular nucleic as well as for the analysis of protein-nucleic acid complexes and for the analysis of mutations.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 36 22 591 C 2

21 Aktenzeichen: P 36 22 591.6-43  
22 Anmeldetag: 4. 7. 86  
43 Offenlegungstag: 14. 1. 88  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 19. 11. 98

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
B 01 D 57/00  
B 01 D 57/02  
G 01 N 25/02  
C 12 Q 1/68  
C 12 Q 1/70  
C 12 Q 3/00  
C 07 H 21/02

DE 36 22 591 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:  
QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE

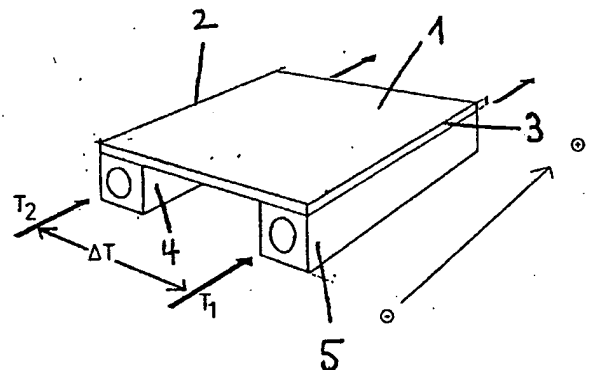
74 Vertreter:  
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,  
50667 Köln

72 Erfinder:  
Rosenbaum, Volker, Dipl.-Phys., 40670 Meerbusch,  
DE; Riesner, Detlev, Prof. Dr., 40589 Düsseldorf, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
THATCHER, D.R., HODSON, B.: "Denaturation of  
proteins and nucleic acids by thernal-cpachient  
electrophoresis" in Biochem. J.(1981)197, 105-109;

54 Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung eines regelbaren und reproduzierbaren Temperaturgradienten und  
seine Verwendung

57 Verfahren zur Herstellung eines regelbaren und repro-  
duzierbaren Temperaturgradienten in flächigen Trennme-  
dien, wobei das flächige Trennmedium auf einer Platte  
angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß eine einzige  
wärmeleitende Platte (1) verwendet wird und die von der  
wärmeleitenden Platte (1) abgewendete Seite des Trenn-  
mediums mit einer wärmeisolierenden Abdeckung (10)  
versehen ist, wobei eine Kante der Platte (1) mittels einer  
oder mehrerer regelbarer Heizvorrichtungen (4) erwärmt  
und die gegenüberliegende Kante der Platte (1) mittels ei-  
ner oder mehrerer regelbarer Kühlvorrichtungen (5) ge-  
kühlt wird.



DE 36 22 591 C 2

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren gemäß Anspruch 1, eine Vorrichtung gemäß Anspruch 6 sowie ihre Verwendung gemäß Anspruch 10.

Es ist bekannt, daß eine Reihe von höhermolekularen Naturstoffen bei steigenden Temperaturen Umwandlungen bzw. irreversible Veränderungen erfahren und daß diese Veränderungen auch analytisch ausgewertet werden können. D. R. Thatcher und B. Hodson haben in *Biochem.* (1981), 197, S. 105-109 die Denaturierung von Proteinen und Nukleinsäuren unter Anwendung eines thermischen Gradienten bei der Elektrophorese untersucht und dabei festgestellt, daß hierbei thermisch verursachte Veränderungen sichtbar gemacht werden können. Zur Erzeugung des thermischen Gradienten haben sie ein Gerät konstruiert, welches von beiden Seiten an eine vertikale Polyacrylamid-Gelplatte gelegt werden konnte, wobei thermostatisch kontrolliertes Wasser verschiedener Temperaturen durch die beiden Enden der Aluminiumplatten geleitet wurde. Die beiden Platten waren miteinander in Serie geschaltet, wobei man annahm, daß sich hierbei ein identischer thermischer Gradient ausgebildet hat.

Diese Vorrichtung ist nicht nur konstruktiv kompliziert und schwierig handhabbar, sondern weist auch den prinzipiellen Fehler auf, daß sich hiermit kein regelbarer und reproduzierbarer Temperaturgradient herstellen läßt. Allein dadurch, daß der Strom des Wasserbades durch die in Serie geschalteten Platten geleitet wurde, hat sich ein unerwünschter und störender Temperaturgradient ausgebildet zwischen Zu- und Ableitung des jeweiligen Wasserbades. Dies wiederum führt zu verschiedenen Temperaturen und nicht-parallelen Temperaturgradienten in den beiden Platten. Dies wiederum führt dazu, daß die Gelelektrophoreseplatte auf der Vorder- und Rückseite verschiedene Temperaturen aufwies.

Die vorliegende Erfindung hat sich zunächst die Aufgabe gestellt, einen regelbaren und reproduzierbaren Temperaturgradienten herzustellen in einer vorgegebenen Richtung von wärmeleitenden Platten für die Auftrennung von Stoffgemischen in flächigen Trennmedien. Dabei sollte dies mit möglichst geringem konstruktiven und apparativen Aufwand erfolgen und dennoch gewährleisten, daß möglichst wenig Störungen auftreten.

Diese Aufgabe konnte jetzt überraschend einfach mit einem Verfahren, das die Merkmale des Anspruchs 1, bzw. einer Vorrichtung gemäß Anspruch 6 aufweist, gelöst werden. Untersuchungen an rechteckigen Platten mit derartigen Heiz- und Kühlvorrichtungen haben gezeigt, daß auf diese Weise in der Platte ein praktisch linearer Temperaturgradient erzeugt werden kann und dieser Temperaturgradient von der Platte auf die angrenzenden flächigen Trennmedien übertragen wird. Es hat sich weiterhin gezeigt, daß bei wärmeisolierender Abdeckung des flächigen Trennmediums auf der Seite, die der Platte abgewandt ist, sich der gleiche Temperaturgradient durch die gesamte Schicht hindurch ausbildet. Die Temperatur auf den beiden Seiten des Trennmediums ist somit nahezu identisch. Es kann daher nicht zu den Störungen kommen, die durch verschiedene Aufheizung der beiden Seiten des Trennmediums durch zwei Platten zu beobachten sind.

Besonders einfach kann sowohl die Erwärmung der einen Kante der Platte als auch die Kühlung der gegenüberliegenden Kante mit Hilfe von thermostatisierten Flüssigkeitsbädern erfolgen. Prinzipiell kann aber auch die Heizung der einen Kante mit Hilfe einer elektrischen Heizung erfolgen, wobei sowohl Heizdrähte als auch Peltier-Elemente in Frage kommen.

Um bei Verwendung von thermostatisierten Flüssigkeitsbädern zu gewährleisten, daß der Energiefluß der Heizvorrichtung einerseits und der Kühlvorrichtung andererseits größer ist als der Energiefluß durch die Platte, genügt es nicht, an den Plattenenden Bohrungen anzubringen, welche von dem Flüssigkeitsbad durchströmt werden. Es werden vielmehr größerdimensionierte Metallblöcke durchbohrt und vollflächig mit den Kanten der Platte verbunden. Vorzugsweise werden einfach oder doppelt durchbohrte Metallblöcke verwendet, die eine deutlich breitere Außenkante aufweisen als die Dicke der wärmeleitenden Platte.

Bei einfach durchbohrten Metallblöcken bildet sich durch den Energiefluß in die Platte ein gewisser Temperaturgradient zwischen Zu- und Ablauf aus. Dieser Temperaturgradient wird dann als relativ geringfügiger Fehler des erfindungsgemäß herzustellenden Temperaturgradienten auf der Platte an diese weitergegeben. Um auch diese Störungen des Temperaturgradienten in der Platte zu vermeiden, verwendet man am einfachsten doppelt durchbohrte Metallblöcke, durch die das jeweilige Flüssigkeitsbad nacheinander in beiden Richtungen durchgepumpt wird. Der Temperaturgradient zwischen eintretendem und austretendem Flüssigkeitsbad wird dadurch geringer und kompensiert sich innerhalb des Metallblocks. Prinzipiell ist es auch möglich, diesen Fehler etwas zu kompensieren, indem man bei einfach durchbohrten Blöcken eine den Temperaturgradienten entsprechende Winkelabweichung von der parallelen Anordnung wählt und so die geringere Temperaturdifferenz zwischen Ausflüssen durch einen geringeren Abstand ausgleicht, was dann zum gleichen Gradienten führt. Wesentlich störender als ein nicht idealer Gradient sind die Abweichungen der Temperatur auf der Ober- und Unterseite von flächigen Trennmedien bei der Verwendung von zwei Platten, deren Temperaturgradient nicht völlig übereinstimmt, so wie dies im Stand der Technik der Fall war.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß es möglich ist, nicht nur wie im Stand der Technik einen Temperaturgradienten senkrecht zur Laufrichtung, sondern auch parallel zur Laufrichtung herzustellen. Hierdurch ist es möglich, gereinigte, chromatographisch einheitlich erscheinende Fraktionen zu untersuchen.

Es wurde bereits in einigen Fällen festgestellt, daß es sich dabei um Substanzgemische handelte, die bei nochmaliger Auftrennung unter Einwirkung eines parallelen Temperaturgradienten aufgetrennt werden konnten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die einzelnen Komponenten des einheitlich erscheinenden Gemisches sich thermisch verschieden verhalten und daher beim Durchwandern des flächigen Trennmediums an verschiedenen Stellen umgewandelt werden und daher ihre Wanderungsgeschwindigkeit verändern. Bei Anwendung eines parallelen Temperaturgradienten ist es weiterhin möglich, gleichzeitig mehrere Proben zu untersuchen.

Bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zusammen mit Gelplatten für die Elektrophorese ist es beispielsweise möglich, Viroide, Satelliten-Ribonukleinsäuren von Viren und Viren mit doppelsträngiger RNA nachzuweisen und zu unterscheiden. Weiterhin ist es möglich, Protein-Nukleinsäure-Komplexe sowie Mutationen zu analysieren, da sich auch diese in sehr spezieller Weise thermisch unterscheiden lassen. Einige dieser Trennprobleme konnten sich bisher nur mit Hilfe der sehr schwer reproduzierbaren und äußerst schwierig herstellbaren Gradientenplatten für Gelelektrophorese lösen lassen. Bekannt geworden sind insbesondere derartige Gradientenplatten mit einem Harnstoffgradienten oder einem Gradienten eines Inhibitors (vgl. L. S. Lerman et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1984, 13, S. 399-423).

Eine besonders einfache und bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in der anliegenden Fig. 1 dargestellt, welche mit ihren Dimensionen geeignet ist, in einem handelsüblichen Gelelektrophorese-Gerät eingesetzt zu werden, nämlich dem LKB 2117 Multiphor II.

In dieser Figur bedeutet

- 1: die wärmeleitende Platte,
- 2: eine Kante und
- 3: die gegenüberliegende Kante,
- 4: eine regelbare Heizvorrichtung und
- 5: eine regelbare Kühlvorrichtung.

In der anliegenden Fig. 2 ist schematisch der Aufbau einer Temperaturgradienten-Gelelektrophorese dargestellt.

In dieser Figur bedeutet

- 1: eine Kupferplatte,
- 5: einen Kühlkanal,
- 6: eine Polytetrafluorethylen-Folie zur elektrischen Isolation,
- 7: eine das Gel tragende Folie,
- 8: das Gel,
- 9: einen Flüssigkeitsfilm zwischen Gel und Abdeckfolie,
- 10: ein Abdeckfolie,
- 11: eine auf der Abdeckfolie liegende Glasplatte,
- 12: eine Glasplatte zum Anpressen der Elektrodenkontakttücher,
- 13: Elektrodenkontakttücher,
- 14: Polyethylenfolie um die Elektrodenkontakttücher,
- 15: Elektrodenpufferbecken
- 16: eine Elektrode und
- 17: eine Geltasche.

Zur Durchführung der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese wird das Gel horizontal auf die Thermostatisierungsplatte gemäß Fig. 1 gelegt. Das elektrische Feld im Gel wird über zwei Filterpapiere oder Schwammtücher hergestellt, die in puffergefüllte Elektrodenkammern führen. Anstelle der für horizontale Elektrophoresen handelsüblichen Filterpapiere haben sich auch in destilliertem Wasser ausgekochte Haushaltsschwammtücher gut bewährt, da sie eine größere Saugfähigkeit und nach dem Autoklavieren geringere mikrobiologische Verunreinigungen zeigen.

Die Thermostatisierungsplatte besteht beispielsweise aus zwei quaderförmigen Kupferblöcken mit quadratischem Querschnitt (210 mm × 30 mm × 30 mm) und einer zentralen zylindrischen Bohrung von 15 mm Durchmesser. Sie werden an den gegenüberliegenden Seiten einer Stirnfläche einer 210 mm × 190 mm × 5 mm großen Kupferplatte angelötet. An die Enden der zylindrischen Bohrung werden Messingolive angebracht, an die die Zu- und Abführungen zweier Wasserthermostaten angeschlossen werden. Die untere Grenze des Temperaturgradienten ( $T_1$ ) wird durch einen kühlbaren Julabo F20-HC Thermostaten und die obere Grenze ( $T_2$ ) durch einen Haake F3 Thermostaten hergestellt. Nach Anschluß der Thermostaten an die Thermostatisierungsplatte stellt sich innerhalb von wenigen Minuten ein konstanter Temperaturgradient ein. Der Temperaturgradient zwischen Einlaß und Auslaß der Kupferblöcke betrug weniger als 0,5°C. Die mit der Apparatur maximal einstellbare Temperaturdifferenz betrug 70°C. Messungen der Temperatur oberhalb und unterhalb des Gels ergaben maximale Abweichungen von 1°C. Die Elektrophorese wurde zunächst bei  $T_1 = T_2 = 10^\circ\text{C}$  und einer Spannung von 100 V begonnen und wieder gestoppt, nachdem an der zurückgelegten Laufstrecke abgeschätzt werden konnte, daß die zu untersuchende Probe vollständig in die Gelmatrix eingedrungen war. Es wurde dann die Spannung abgeschaltet, das Gel einschließlich der Auftragstasche mit Elektrodenpuffer überschichtet und mit der hydrophilen Seite einer Gelbondfolie

luftblasenfrei abgedeckt. Diese Maßnahme und das Überziehen der in die puffergefüllten Elektrodengefäße führenden Schwammtücher mit handelsüblicher Haushaltsfolie hat sich als wirksamer Schutz gegen Austrocknung erwiesen. Auf die Abdeckfolie wurden zur thermischen Isolation des Gels noch zwei 5 mm dicke Glasplatten gelegt, durch die man die Bewegung der Farbstoffindikatoren im Gel verfolgen kann. Dann wird der Temperaturgradient erzeugt, indem die Heizung und Kühlung eingestellt werden. In weniger als 5 Minuten hat sich auf der Thermostatisierungsplatte und im Gel ein linearer Gradient eingestellt. Um eine vollständige Gleichgewichtseinstellung der Konformation der zu untersuchenden Proben zu gewährleisten, wurde vorsichtshalber weitere 10 Minuten equilibriert. Diese Zeitdauer der Equilibrierung ist ein Kompromiß zwischen möglichst vollständiger Equilibrierung der zu untersuchenden Probe und einer möglichst geringen Diffusion der Probe in der Gelmatrix. Danach wird in einem dritten Schritt die Elektrophorese eingeschaltet bei einer Spannung von 300 V. Abgeschaltet wird, wenn im Indikator zu erkennen ist, daß die Probe nahezu am anderen Ende der Gelplatte angelangt ist.

Das Verfahren wurde inzwischen erfolgreich angewendet für den Nachweis und die Unterscheidung von Viroiden, die Diagnose von Viren, die doppelsträngige oder zirkuläre Nukleinsäure enthalten, sowie den Nachweis und die Charakterisierung verschiedener Stämme, beispielsweise vom Rotavirus.

Weiterhin war es möglich, die symptomregulierenden Satelliten-RNAs am Beispiel des Gurkenmosaikvirus und des Erdnußstauchevirus experimentell zu belegen und eindeutig zwischen symptomverstärkenden und symptomabschwächenden Satelliten-RNAs zu unterscheiden. Schließlich ist es gelungen, Protein-Nukleinsäure-Komplexe zu analysieren und in einem Beispiel experimentell zu belegen, daß durch eine Mutation in einer regulatorischen Sequenz eine einfach zu analysierende Fehlfunktion feststellbar war. Die Methode ist daher auch geeignet, Mutationen in Proteinen zu analysieren. Es konnten Mutanten analysiert werden, die sich nur geringfügig in ihrer Nuklotialsequenz unterscheiden. Eine solche Analyse war bisher nur mit dem aufwendigen Harnstoffgradienten-Verfahren möglich.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines regelbaren und reproduzierbaren Temperaturgradienten in flächigen Trennmedien, wobei das flächige Trennmedium auf einer Platte angeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine einzige wärmeleitende Platte (1) verwendet wird und die von der wärmeleitenden Platte (1) abgewendete Seite des Trennmediums mit einer wärmeisolierenden Abdeckung (10) versehen ist, wobei eine Kante der Platte (1) mittels einer oder mehrerer regelbarer Heizvorrichtungen (4) erwärmt und die gegenüberliegende Kante der Platte (1) mittels einer oder mehrerer regelbarer Kühlvorrichtungen (5) gekühlt wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die Erwärmung der einen Kante als auch die Kühlung der gegenüberliegenden Kante mit Hilfe von thermostatisierten Flüssigkeitsbädern erfolgt.
3. Verfahren gemäß Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Erwärmung der einen Kante mit Hilfe einer elektrischen Heizung erfolgt.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als flächiges Trennmedium für Stoffgemische Gelplatten für die Elektrophorese

verwendet werden.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als flächiges Trennmedium für Stoffgemische Chromatographieplatten verwendet werden.

6. Vorrichtung zur Herstellung eines regelbaren und reproduzierbaren Temperaturgradienten in einem flächigen Trennmedium für die Auftrennung von Stoffgemischen, wobei das flächige Trennmedium auf einer wärmeleitenden Platte angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung eine einzige wärmeleitende Platte (1), eine wärmeisolierende Abdeckung (10) auf der von der wärmeleitenden Platte (1) abgewandten Seite des flächigen Trennmediums (8) eine oder mehrere regelbare Heizvorrichtungen (4) an der einen Kante (2) und eine oder mehrere regelbare Kühlvorrichtungen (5) an der gegenüberliegenden Kante (3) der wärmeleitenden Platte (1) aufweist.

7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die Heizvorrichtungen (4) als auch die Kühlvorrichtung (5) aus thermostatisierten Flüssigkeitsbädern bestehen.

8. Vorrichtung gemäß Ansprüchen 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Heizvorrichtung einen elektrischen Heizdraht oder Peltier-Elemente enthält.

9. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie dimensionsmäßig adaptiert ist für kommerzielle Gelelektrophorese-Geräte.

10. Verwendung einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9 zur Auftrennung von Stoffgemischen, in denen mindestens eine Komponente im Temperaturbereich des Temperaturgradienten eine thermische Umwandlung erfährt.

11. Verwendung einer Vorrichtung gemäß Anspruch 10 zum Nachweis und zur Unterscheidung von Viroiden, viralen Nukleinsäuren, Satelliten-RNAs, zur Analyse von Mutationen in Nukleinsäuren, zur Analyse von Mutationen in Proteinen und zur Analyse von Protein-Nukleinsäure-Komplexen.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

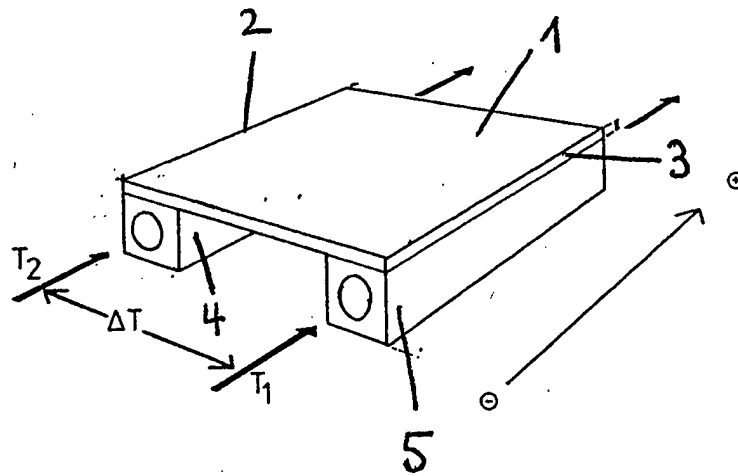


Fig. 1

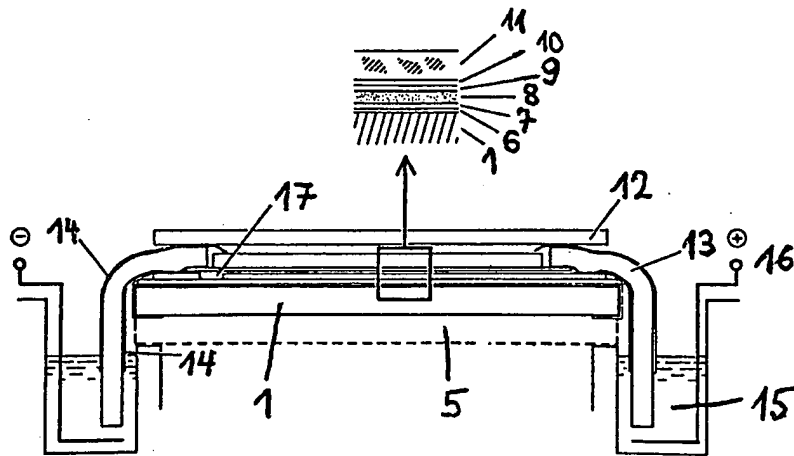


Fig. 2